

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-090815

(43)Date of publication of application : 28.03.2003

(51)Int.Cl.

G01N 27/327

C12M 1/00

C12N 15/09

C12Q 1/68

G01N 27/416

G01N 27/48

G01N 33/483

G01N 33/53

G01N 37/00

(21)Application number : 2001-283412

(71)Applicant : JAPAN SCIENCE & TECHNOLOGY
CORP

(22)Date of filing : 18.09.2001

(72)Inventor : KAWAI TOMOJI
SAI TATSUNARI
RI HEYON
TANIGUCHI MASATERU

(54) METHOD FOR ELECTROCHEMICALLY DETECTING GENE, AND NUCLEIC ACID TIP

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for measuring the complementary nucleic acid base pair which can simply detect the complementary nucleic acid base pair at a low cost without requiring any marker or modification of the nucleic acid.

SOLUTION: In a method for electrochemically detecting the complementary nucleic acid base pair, a method for electrochemically detecting genes comprises at least a step of bringing a single strand target nucleic acid into contact with a nucleic acid immobilized minute electrode obtained by immobilizing the probe nucleic acid to a minute electrode, and a step of measuring the change in the oxidation-reduction potential in the nucleic acid immobilized minute electrode.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 18.12.2003

[Date of sending the examiner's decision of
rejection][Kind of final disposal of application other than
the examiner's decision of rejection or
application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of
rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-90815

(P2003-90815A)

(43) 公開日 平成15年3月28日 (2003.3.28)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト* (参考)
G 0 1 N 27/327		C 1 2 M 1/00	A 2 G 0 4 5
C 1 2 M 1/00		C 1 2 Q 1/68	Z N A A 4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/09		G 0 1 N 27/48	A 4 B 0 2 9
C 1 2 Q 1/68	Z N A	33/483	F 4 B 0 6 3
G 0 1 N 27/416		33/53	M
審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 9 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2001-283412(P2001-283412)

(22) 出願日 平成13年9月18日 (2001.9.18)

(71) 出願人 396020800

科学技術振興事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(72) 発明者 川合 知二

大阪府箕面市小野原東5丁目26-15-615

(72) 発明者 崔 龍成

大阪府茨木市南春日丘6丁目7-28 山崎
荘202号

(72) 発明者 リ ヘヨン

大阪府箕面市小野原東3丁目8-32

(74) 代理人 100093230

弁理士 西澤 利夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遺伝子の電気化学的検出方法と核酸チップ

(57) 【要約】

【課題】 核酸の標識や修飾を必要とせず、簡便に安価で相補的核酸塩基対を検出できる相補的核酸塩基対の測定方法を提供する。

【解決手段】 相補的核酸塩基対を電気化学的に検出する方法であって、少なくとも、微小電極に1本鎖プローブ核酸を固定化して得られる核酸固定化微小電極に1本鎖ターゲット核酸を接触させる工程と、該核酸固定化微小電極における酸化還元電位の変化を測定する工程を有する遺伝子の電気化学的検出方法とする。

(2)

【特許請求の範囲】

【請求項1】 相補的核酸塩基対を電気化学的に検出する方法であって、少なくとも、微小電極に1本鎖プローブ核酸を固定化して得られる核酸固定化微小電極に1本鎖ターゲット核酸を接触させる工程と、該核酸固定化微小電極における酸化還元電位の変化を測定する工程を有することを特徴とする遺伝子の電気化学的検出方法。

【請求項2】 相補的核酸塩基対を電気化学的に検出するためのチップであって、基板上に、微小電極にチオール基を介して1本鎖プローブ核酸が結合固定化された核酸固定化微小電極が設置されていることを特徴とする核酸チップ。

【請求項3】 核酸固定化微小電極が複数設置されている請求項2の核酸チップ。

【請求項4】 核酸固定化微小電極は、各々の面積が1mm²未満である請求項2または3のいずれかの核酸チップ。

【請求項5】 基板上に、1本鎖ターゲット核酸および／または電解質溶液を核酸固定化微小電極と接触させるためのマイクロウェルを有する請求項2ないし4のいずれかの核酸チップ。

【請求項6】 請求項1の方法によって相補的核酸塩基対を電気化学的に検出できる装置であって、少なくとも、請求項2ないし5のいずれかの核酸チップと、電気化学測定手段と、解析手段と、解析結果表示手段を有することを特徴とする自動遺伝子診断装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】この出願の発明は、相補的遺伝子を電気化学的に検出する方法とそのための核酸チップに関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、1本鎖プローブ核酸を固定化した核酸固定化微小電極における1本鎖ターゲット核酸とのハイブリダイゼーションの有無を電気化学的に検出する方法と、そのための核酸チップに関するものである。

【0002】

【従来の技術とその課題】DNA、酵素、抗体、ペプチド等の生体分子が独自の特異的分子認識能を有していることはよく知られており、これら分子認識能のバイオセンサーへの応用が盛んに研究、報告されている。

【0003】近年、ヒトゲノムをはじめとする生物の遺伝子構造が次々と解明され、様々な遺伝的疾患やウィルス性疾患において遺伝子の変異が関与することが明らかになってきている。そのため、DNAを生物素として用いるバイオセンサー、中でもDNAセンサーが集積化されたDNAチップは多種類の遺伝子の配列や変異、あるいは機能を迅速に解明する手法として注目されており、医学、分子生物学等の広い分野で基盤技術となることが期待される。

【0004】現在実用化されているDNAチップとして

は、DNA固定化担体としてニトロセルロース膜、シリコン基板、ガラス基板、高分子、電極などを用いた各種のものがある。また、DNAの基板への固定化方法も、化学的結合法やDNAが負電荷を帯びている性質を用いて、特定位置に正電位をかけることで電極上にプローブDNAを固定化する電気化学的固定化法が知られている。

【0005】このようなDNAチップでは、一般に、配列の異なる多数の1本鎖DNAが整列固定化されている。これに蛍光標識した1本鎖ターゲットDNAを反応させれば、互いに相補的な遺伝子のみが2本鎖DNAを形成するので、その部分の蛍光強度を測定することにより、遺伝子機能の解析や疾患に関与する遺伝子を検出できる。

【0006】しかし、このような従来の蛍光検出型DNAチップでは、あらかじめフルオレセイン、ローダミン、Cy3、Cy5などの蛍光色素でターゲットDNAを標識しておく必要があるため、作業性が煩雑となるという問題があった。また、DNAチップ上で発せられる蛍光シグナルは、共焦点レーザー顕微鏡、蛍光スキャナーなどを搭載した解析装置で検出、画像化、解析されるため、大型で高価な設備を必要とするという問題もあった。

【0007】さらに、疾患易罹性や薬剤反応性に関連する遺伝子の探索における多型マーカーとして近年注目されている一塩基多型(SNPs)の検出では、安定性の微妙に異なる多種類のDNAを、特定温度下、溶液中で同時に測定することが必要であるが、従来の蛍光検出型DNAチップは、乾燥下での測定を対象とするため、このような測定が不可能であった。

【0008】これらの問題を解決するものとして、電気化学的に遺伝子を検出する方法が研究されている。電気化学的遺伝子検出方法は、非標識での遺伝子の検出を可能とする、汎用の装置を利用できるため低価格が実現される、装置全体の簡略化や小型化が可能になる、などの多くの利点が期待される。

【0009】これまでに報告されている遺伝子の電気化学的検出方法としては、例えば、金電極上にホスホチレート基を介してビオチン化プローブ核酸を固定化し、プローブと1本鎖ターゲット核酸を接触させることによりハイブリッドを形成させ、さらにビオチンと特異的に相互作用するアビジンを結合した酵素を反応させてその酵素反応に基づく電気信号から遺伝子を検出するものがある(Langmuir, 1999, 15, 3703)。しかし、このような方法は、プローブ核酸の固定化、ハイブリダイゼーション、タンパク質相互作用、酵素反応、生成物の電極上への析出という多くの操作を必要とし、簡便とは言いがたかった。

【0010】また、金電極上にチオールアンカーを介して化学吸着させたプローブ核酸を用いてナフタレンフ

(3)

3

エロセン酸化還元インタカレーターによって遺伝子を検出する方法が報告されている (Anal. Chem. 2000, 72, 1334)。しかし、インタカレーターを電極活性プローブとして用いる方法では、一般的に1本鎖DNAと2本鎖DNAの識別は可能なものの、インタカレーターの結合領域に配列依存性があるため、分析物に対応したインタカレーターを選択する必要があるという問題があった。

【0011】さらに、ガラス状カーボン電極上に導電性酸化還元高分子膜を形成し、酵素 (HRP) でラベルした (dT) 25-30または (dA) 25-30を共有結合させ、相補的核酸とのハイブリダイゼーションによって起こる酵素反応に基づく電気信号を検出する方法 (Anal. Chem. 1999, 71, 394) では、核酸を酵素でラベルする際に煩雑な操作を必要とする上、過剰なラベル酵素を洗浄除去する必要があり、測定精度が必ずしも安定しないという問題があった。

【0012】そして、以上のような従来の電気化学的検出方法では、いずれの場合も、酸化・還元物質やインタカレーターを使用するため、煩雑な操作を要し、測定のコストも高くなるという問題もあった。

【0013】遺伝子の電気化学的検出方法として、indicator-freeな方法も報告されているが (Anal. Chem. 2000, 72, 1334-1341)、これは、塩基配列にグアニン

(G) がなければならぬなどの制限があり、汎用性が小さかったのが実情である。

【0014】そこで、この出願の発明は、以上のとおり事情に鑑みてなされたものであり、従来技術の問題点を解消し、プローブ核酸やターゲット核酸の標識を必要とせず、相補的核酸塩基対を簡便かつ高精度に検出できる遺伝子の検出方法と、そのための小型化が容易で低価格な核酸チップを提供することを課題としている。

【0015】

【課題を解決するための手段】この出願の発明は、上記の課題を解決するものとして、まず第1には、相補的核酸塩基対を電気化学的に検出する方法であって、少なくとも、微小電極に1本鎖プローブ核酸を固定化して得られる核酸固定化微小電極に1本鎖ターゲット核酸を接触させる工程と、該核酸固定化微小電極における酸化還元電位の変化を測定する工程を有することを特徴とする遺伝子の電気化学的検出方法を提供する。

【0016】第2には、この出願の発明は、相補的核酸塩基対を電気化学的に検出するためのチップであって、基板上に、微小電極にチオール基を介して1本鎖プローブ核酸が結合固定化された核酸固定化微小電極が設置されていることを特徴とする核酸チップを提供する。

【0017】また、この出願の発明は、第3には、核酸固定化微小電極が複数設置されている核酸チップを、第4には、微小電極の面積が各々1mm²未満である核酸チップを、そして、第5には、基板上に1本鎖ターゲット核酸および／または電解質溶液を核酸固定化微小電極

4

と接触させるためのマイクロウェルを有する核酸チップを提供する。

【0018】この出願の発明は、さらに、第6には、相補的核酸塩基対を電気化学的に検出できる装置であって、少なくとも、前記いずれかの核酸チップと、電気化学測定手段と、解析手段と、解析結果表示手段を有することを特徴とする自動遺伝子診断装置をも提供する。

【0019】

【発明の実施の形態】発明者らは、鋭意研究を進めた結果、核酸固定化微小電極上の1本鎖プローブ核酸と1本鎖ターゲット核酸が相補性を示し、ハイブリッドを形成するとき、酸化還元電位に明確な変化が見られることを見出し、この出願の発明の遺伝子の電気化学的検出方法に至った。

【0020】すなわち、この出願の発明の遺伝子の電気化学的検出方法は、微小電極に1本鎖プローブ核酸を固定化した核酸固定化微小電極と1本鎖ターゲット核酸を接触させ、該核酸固定化微小電極における酸化還元電位を測定するだけで、簡単に相補的核酸塩基対を検出できるというものである。この出願の発明の遺伝子の電気化学的検出方法では、まず、核酸固定化微小電極の電気化学測定を行い、その後1本鎖ターゲット核酸を該核酸固定化微小電極に接触させ、同様に電気化学測定を行う。このとき、核酸固定化微小電極上の1本鎖プローブ核酸と1本鎖ターゲット核酸が相補性を有し、ハイブリッドを形成していれば酸化還元電位に変化が現れる。しかし、核酸固定化微小電極上の1本鎖プローブ核酸と1本鎖ターゲット核酸がハイブリダイゼーションしない場合には、酸化還元電位に変化は見られない。

【0021】この出願の発明の遺伝子の電気化学的検出方法では、以上のとおりに、少なくとも、(1) 核酸固定化微小電極と1本鎖ターゲット核酸を接触させる工程と、(2) 電気化学測定を行う工程を有していればよいが、生化学実験操作において通常用いられる各種の工程を含んでいてもよい。具体的には、1本鎖ターゲット核酸を核酸固定化微小電極と接触させた後、一定温度でハイブリダイゼーション反応させる工程や、ハイブリッドを形成せずに1本鎖プローブ核酸に物理吸着している1本鎖ターゲット核酸を除去するための洗浄工程が好ましく例示される。

【0022】この出願の発明の遺伝子の電気化学的検出方法において、上記(1)の核酸固定化微小電極と1本鎖ターゲット核酸を接触させる方法としては、各種のものが考慮され、その詳細な条件等は限定されない。例えば、候補となる1本鎖ターゲット核酸を含有する溶液に核酸固定化微小電極を浸漬させる方法、核酸固定化微小電極表面に1本鎖ターゲット核酸を含有する溶液を滴下、塗布する方法等が挙げられる。さらに、核酸固定化微小電極を基板上に構築し、該基板上の核酸固定化微小電極と接触する位置にマイクロウェルを設け、1本鎖タ

(4)

5

ターゲット核酸を含有する溶液を導入できるようにしてもよい。このとき使用される1本鎖ターゲット核酸を含有する溶液には、pH調整剤（緩衝剤）や各種の塩類等が含有されていてもよく、また、溶液の温度を制御してハイブリダイゼーション反応を起こさせてもよい。

【0023】この出願の発明の遺伝子の電気化学的検出方法では、従来の検出方法と異なり、溶液中での精度高い相補的核酸塩基対の検出が可能である点が特徴的である。したがって、前記（2）の電気化学測定としては、電解質溶液中で行われる一般的な電気化学測定法を適用
10 できる。例えば、前記核酸固定化微小電極を作用電極とし、対極や参照電極を同一の電解質溶液中に設置し、電源や解析装置に接続する方法が挙げられる。具体的には、ポテンシオスタットやガルバノスタットを用いた電気化学測定法が例示される。このような従来の電気化学測定法では、電解質溶液中のpHや塩濃度、溶液温度等の各種条件を適宜選択することができるため、この出願の発明の遺伝子の電気化学的検出方法は、特殊な測定条件を要する遺伝子の検出にも適用できる。

【0024】また、この出願の発明では、以上のとおりの遺伝子の電気化学的検出方法のための核酸チップをも提供
20 する。このような核酸チップは、基板上に上記核酸固定化微小電極を構築してなるものである。すなわち、基板上に、微小電極を設置し、その表面に1本鎖プローブ核酸を固定化させて得られる。

【0025】このとき、基板は、ガラス、シリコン、各種プラスチック等から適宜選択できる。中でもガラスは、各種の方法により微細加工できる上、安価なことから好ましく用いられる。基板上に微小電極を構築する方法としては、真空蒸着法や半導体微細加工技術を応用
30 したフォトリソグラフィ技術が例示される。とくに微細な電極や配線を作成し、1つの基板上に多くの微小電極を設けるためには、フォトリソグラフィ技術、蒸着技術、エッチング技術などを組み合わせたフォトリソグラフィ技術が好ましく適用される。

【0026】具体的には、まず、真空蒸着やスパッタリングなどの蒸着技術により基板上に電極材料となる金属薄膜を形成させ、スピンドクターを用いて金属薄膜上に感光性材料（フォトレジスト）を塗布する。使用されるフォトレジストは、露光によって材料が分解して現像液に溶解するもの（ポジ型）であっても露光により重合して溶解しなくなるもの（ネガ型）であってもよい。次にフォトレジスト膜の上に微細な電極や回路をデザインしたフォトリソグラフィマスクを設置し、露光することによりパターンを転写する。さらに、現像液に浸してレジストをパターニングし、エッチング液に浸して金属薄膜をエッチングすれば、デザインした微小電極アレイが作製できる。

【0027】このようなフォトリソグラフィ技術は、ICやLSIの製造技術として確立されている。したがって、この方法を用いれば、核酸チップの自動生
50

6

産、大量生産が容易となり、製造コストを低下することができる。また、形成する金属薄膜の種類を変化することにより、電極材料や配線の材料を各種の材料から選択できる。具体的には、金、銀、白金、Al、ガラス状カーボンディスク、導電性高分子フィルム等が好ましく例示される。なかでも、金は、扱い易く、DNAの固定化が安定に行えるため、電極材料として好ましい。さらに、フォトリソグラフィのデザインを変えることにより、1つの基板上に設置される微小電極の数を必要に応じて設定
10 できる。例えば、後述の実施例では、26mm×50mmのガラス基板上に320～360個の微小電極を構築している。

【0028】この出願の発明の核酸チップは、以上のとおりの方法により基板上に構築された微小電極上に1本鎖プローブ核酸を固定化して得られる。このとき使用される1本鎖プローブ核酸は、1本鎖DNAに限定されず、RNAやPNA等であってもよい。例えば1本鎖ターゲット核酸が相補性を示し、ハイブリダイゼーションする遺伝子を調べたい場合には、候補となる核酸を1本鎖プローブ核酸として微小電極上に固定化すればよい。核酸チップ上の基板に複数の微小電極が構築されている場合には、各電極に異なる1本鎖プローブ核酸を設置し、各電極について酸化還元電位の変化を測定すれば、簡便に、短時間で相補的核酸塩基対を検出することが
20 できる。

【0029】この出願の発明の核酸チップにおいて、微小電極に1本鎖プローブ核酸を固定化させる方法はどのようなものであってもよい。本願発明は、前記のとおり、溶液中で相補的核酸塩基対を検出できるものであることから、電解液等の溶液中で一度固定化された1本鎖プローブ核酸が遊離しない方法を選択することが必要である。好ましくは、1本鎖プローブ核酸の末端にチオール基を結合させ、微小電極に結合固定化させる方法（例えばAnal. Chem. 2000, 72, 1334）が例示される。もちろん、これ以外の公知あるいは新規の電極材料への1本鎖核酸の固定化方法を適用してもよい。

【0030】以上のとおりのこの出願の発明の核酸チップは、小型の基板上に多数の核酸固定化微小電極を有するものとすることができる。また、この出願の発明の遺伝子の電気化学的検出方法は、従来法のように酵素反応や酸化・還元物質、インタカレーター等を使用しないため、煩雑な操作を必要とせず、ポテンシオスタット等の汎用の電気化学測定装置を用いて簡便で精度高い測定を可能とするものである。後述の実施例からも明らかなように、本願発明の遺伝子の電気化学的検出方法では、 $\sim 0.1 \text{ fM}$ という検出範囲を有するため、微量（極低濃度）の試料から遺伝子診断を行うことが可能となる。

【0031】さらに、この出願の発明は、以上のとおりの核酸チップを用いて遺伝子の電気化学的検出を行うための装置をも提供する。このような自動遺伝子診断装置
50

(5)

7

は、電気化学測定手段と、解析手段と、解析結果表示手段を有していればよく、例えば電源、発信機、解析用チップ、液晶モニター、プリンター等から構成されるものが挙げられる。また、このような自動遺伝子診断装置は、電源、発信機、解析装置等を簡略化した回路を構築することにより小型化することができる。したがって、近年医療現場での重要性が高まっているポイント・オブ・ケア検査(POCT)を可能とする携帯型自動遺伝子診断装置としても期待される。

【0032】以下、添付した図面に沿って実施例を示し、この発明の実施の形態についてさらに詳しく説明する。もちろん、この発明は以下の例に限定されるものではなく、細部については様々な態様が可能であることは言うまでもない。

【0033】

【実施例】【実施例1】 DNAチップの作成

(1) 微小金電極アレイの作製

図1に微小電極アレイの作成工程の概要を示した。

【0034】(a) スライドガラス(100)(MATSUMI社製、76 mm×27 mm、厚さ1.2~1.5 mm)を適当な大きさに切断して約26 mm×50 mmとし、水洗した後、超純水(Milli Q)中で30分間、電子工業用アセトン(関東化学)で30分間、さらに超純水で30分間超音波洗浄した。

【0035】(b) ターボ式真空蒸着装置(Varian社製、JTM200R)を用いて、約 5×10^{-5} Torr以下の真空状態で純度99.95%のAl(ニラコ株式会社)を約200 Å蒸着し、続いて純度99.95%の金(ニラコ株式会社)を約200 Å蒸着し、Al/Au薄膜(110)を形成した。

【0036】(c) 基板の上に、スピナー(初速500 rpm×3 sec、本速5500 rpm×20 sec、slope 2 sec)でポジ型レジスト(S1818、Shipley)を均一に塗布し、レジスト層(111)を形成した。

【0037】(d) この基板を110℃で1分間加熱した後、予めAdobe Illustrator8でデザインし、フィルム出力(山田製版)したフォトマスクを固定し、露光(25秒)して、現像液(MF-319、Shipley)×30 sec、純水×30 secで現像した。

【0038】(e) KI(和光純薬工業)40g、I₂(和光純薬工業)10gを超純水400mlに溶解したもので金×1 ml、純水×30 secでエッチングした後、HNO₃(和光純薬工業)50ml、CH₃COOH(和光純薬工業)200ml、H₃PO₄(和光純薬工業)200mlを超純水50mlに溶解したものでAl(40℃×10秒、純水×30秒)をエッチングした。

【0039】(f) remover(1165、Shipley)60℃×10秒、アセトン(関東化学)、エタノール(和光純薬工業)の順でレジストの犠牲層をはがすことにより微小電極アレイを作製した。

【0040】(g) リード線部分を被覆するために再び

8

ポジ型レジスト(S1818、SHIPLEY)を塗布してレジスト層(112)を形成した後、オープンで加熱した後、

(h) 別のマスクパターンを用いて露光、現像し、微小電極(11)部分および外部接続電極(リードワイヤ)(12)部分を露出させた。

【0041】得られた微小金電極アレイを図2に示した。

【0042】この微小金電極アレイには、1本鎖ターゲットDNAとのハイブリダイゼーション反応を行う際に1本鎖ターゲットDNA含有溶液をマイクロピペットで滴下するためのマイクロウェル(13)を構築した。

(2) 1本鎖プローブDNAの固定化

50merのpoly(dA)(配列番号1)を1本鎖プローブDNAとした。

【0043】一方、ターゲットDNAとしては、50merのpoly(dT)(配列番号2)、50merのpoly(dG)(配列番号3)、50merのpoly(dC)(配列番号4)、および配列番号2のpoly(dT)における5'末端から13番目~18番目までの6個のTをAACCGGとしたミスマッチDNA(配列番号5)を準備した。

【0044】まず、配列番号1のオリゴヌクレオチドの5'末端にチオール基を導入したもの(0.2 μg逆相HPLC精製したプローブDNAから「日清紡研究開発センター」にて合成)にTE buffer(10mM Tris-HCl(pH8.0) and 1mM EDTA(pH8.0)、和光純薬工業(株)製)をチオール修飾1本鎖プローブDNAとし、適当量加えて希釈した。マイクロピペットを用いて、チオール修飾1本鎖プローブDNA(50 μM、0.5 μl)溶液(100 mM KCl)を微小金電極(11)上にスポットし、5℃で24時間反応させ、1本鎖プローブDNAを固定化した。

【0045】固定化反応後、KCl buffer(100mM、和光純薬工業(株)製)を用いて電極を洗浄し、微小金電極(11)上に結合固定化されていないプローブDNAを除去した。

【実施例2】 DNAチップを用いた電気化学測定

(1) DNAチップの酸化還元電位の確認

1本鎖プローブDNAを固定化していない微小金電極アレイ(1)および配列番号1の1本鎖プローブDNAを固定化したDNAチップ(1')を各々25℃のKCl溶液(100mM、20 μl)(2)に浸漬し、3電極法によるサイクリックボルタメトリーを行った。

【0046】図3に電気化学測定装置の概略を示した。

【0047】参照電極(3)は銀とし、比較電極を用いて対比して電位のずれが±1mV以内であることを確認した後用いた。対極(4)には白金線を用いた。

【0048】測定は、DNAチップ(1')からリードワイヤ(12)を引き出し、ポテンシオスタット(5)に接続して行った。測定は、掃引速度50mV/sで-400~700mVの範囲で4回繰り返した。コンピュータ(6)で解析し、得られたサイクリックボルタモグラムを図4に示

9

した。

【0049】1本鎖プローブDNAを固定化していない微小金電極アレイ(1)では、金由来の酸化還元ピーク(約 $-23\mu\text{A}$)が得られた(図4a)。一方、プローブDNAを固定化したDNAチップ(1')では、金由来のピークはほとんど見られなかった(図4b)。

【0050】これより、1本鎖プローブDNAの固定化により微小金電極(11)が絶縁されたことが確認された。

(2) ハイブリダイゼーション

実施例1で作成したDNAチップに、ハイブリダイゼーションバッファー(100mM KCl and 5mM Tris-HCl (pH8.0)、和光純薬工業(株)製)で調製した1本鎖ターゲットDNA(配列番号2)(0.01 μM ~50 μM 、0.5 μl)をマイクロピペットでスポットし、5℃で24時間反応させ、1本鎖ターゲットDNAをハイブリダイゼーションした。ハイブリダイゼーション後、ハイブリダイゼーションバッファーで微小金電極(11)を洗浄して非特異的に吸着しているDNAを除去した。

【0051】得られたサイクリックボルタモグラムの図4cに示した。

【0052】サイクリックボルタモグラムにおいて、金由来の酸化還元ピークは完全に消失し、電流値も1/10程度になった。これより、1本鎖プローブDNAに1本鎖ターゲットDNAがハイブリダイゼーションし、微小金電極(11)上のDNAの密度が高まり、微小金電極(11)が完全に絶縁されたことが示された。

【比較例1】実施例1で作成したDNAチップ(1')に、実施例2と同様の方法でコントロールDNA(配列番号3)を接触させ、反応させた。

【0053】しかし、いずれの場合も酸化・還元電流-電位曲線はDNAチップ(1')単独の酸化・還元電流-電位曲線とほぼ同じであった(図4d)。すなわち、poly(dG)(配列番号3)がプローブDNAであるpoly(dA)にハイブリダイゼーションしないことが電気化学的に確認された。

(6)

10

*【0054】この操作を4回繰り返したところ、いずれの場合も再現性が確認された。

【0055】同様に、poly(dC)(配列番号4)やpoly(dT)のミスマッチDNA(配列番号5)についても同様の操作を行ったところ、poly(dA)とのハイブリダイゼーションが起こらないことを電気化学的に確認できた。

【実施例3】 ターゲットDNAの濃度測定

実施例1で作成されたpoly(dA)(配列番号1)をプローブDNAとして有するDNAチップに対し、ターゲットDNA(配列番号2)の濃度を1nM~25nMまで変え、酸化・還元電流-電位曲線を得た。ターゲットDNAの濃度と酸化・還元ピークの関係を図5に示した。

【0056】0.1fM~50 μM まで直線的な関係が示されたこと、およびプローブDNAのみの酸化還元ピークに外挿した結果より、この出願の発明のDNAチップを用いることにより、相補的核酸塩基対を、0.1fMという極微量のターゲットDNAから検出できることが示唆された。つまり、この発明の相補的核酸塩基対の電気化学的測定方法は、従来法に比べて広い検出精度を有することが確認された。

【0057】

【発明の効果】以上詳しく説明したとおり、この発明によって、精度高く、簡便に相補的核酸塩基対を検出、定量する方法とそのための核酸チップが提供される。

【0058】この発明の核酸チップは、プローブ核酸やターゲット核酸を標識する必要がなく、電気化学的にハイブリダイゼーションを検出できるため、測定には汎用の装置を用いることができ、煩雑な操作や高価な試薬、さらには設備等を必要としない。また、この核酸チップを用いることにより、遺伝子診断装置の小型化、携帯化が容易となることから、遺伝子疾患やウイルス性疾患のポイント・オブ・ケア検査、あるいは早期診断に有用といえる。

【0059】

【配列表】

*

<110> 科学技術振興事業団 (Japan Science and Technology Corporation)

<120> 遺伝子の電気化学的検出方法と核酸チップ

<130> NP01354-SH

<160> 5

40

<210> 1

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> Synthesized Oligonucleotide

<400> 1

aaaaa aaaaa aaaaa aaaaa aaaaa aaaaa aaaaa aaaaa aaaaa aaaaa 50

<210> 2

<211> 50

<212> DNA

、50

(7)

//

12

```

<213> Artificial Sequence
<220> Synthesized Oligonucleotide
<400> 2
      ttttt ttttt ttttt ttttt ttttt ttttt ttttt ttttt ttttt ttttt    50
<210> 3
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220> Synthesized Oligonucleotide
<400> 3
      ggggg ggggg ggggg ggggg ggggg ggggg ggggg ggggg ggggg ggggg    50
<210> 4
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220> Synthesized Oligonucleotide
<400> 4
      ccccc ccccc ccccc ccccc ccccc ccccc ccccc ccccc ccccc ccccc    50
<210> 5
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220> Synthesized Oligonucleotide
<400> 5
      ttttt ttttt ttaac cggtt ttttt ttttt ttttt ttttt ttttt ttttt    50

```

【図面の簡単な説明】

【図1】この発明のDNAチップの製造工程を例示した概略模式図である。

【図2】この出願の発明の実施例により得られた微小金電極アレイの写真を示した図である。

【図3】この発明の実施例において相補的核酸塩基対の電気化学的測定に用いられた装置の概略を示した模式図である。

【図4】この発明の実施例における電気化学測定より得られたサイクリックボルタモグラムを示した図である。

(a : 微小金電極アレイのみ、b : 1本鎖プローブ核酸 (poly (dA)) を固定化したDNAチップ、c : 1本鎖ターゲットDNA (poly (dT)) と反応後 (ハイブリダイゼーションあり)、d : 1本鎖ターゲットDNA (poly (dG)) と反応後 (ハイブリダイゼーションなし))

【図5】この発明のDNAチップを用いてハイブリダイゼーションを電気化学的に測定した際のターゲットDN

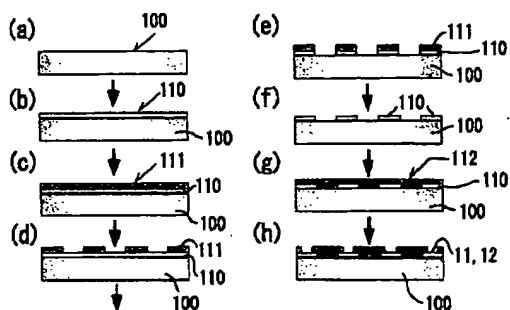
Aの濃度と得られる酸化・還元ピークの関係を示した図である。

【符号の説明】

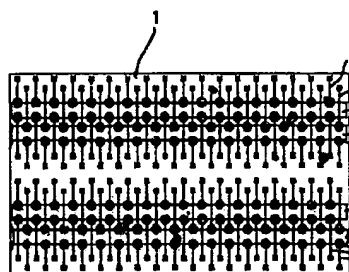
- 1 微小金電極アレイ
- 1' DNAチップ
- 11 微小金電極、作用電極
- 12 リードワイヤ
- 13 マイクロウェル
- 100 ガラス基板
- 110 Al/Au薄膜
- 111 レジスト層
- 112 レジスト層
- 2 電解質溶液 (KCl)
- 3 参照電極 (Ag)
- 4 対極 (Pt)
- 5 ポテンシオスタット
- 6 コンピュータ

(8)

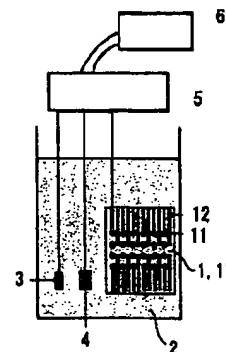
【図1】



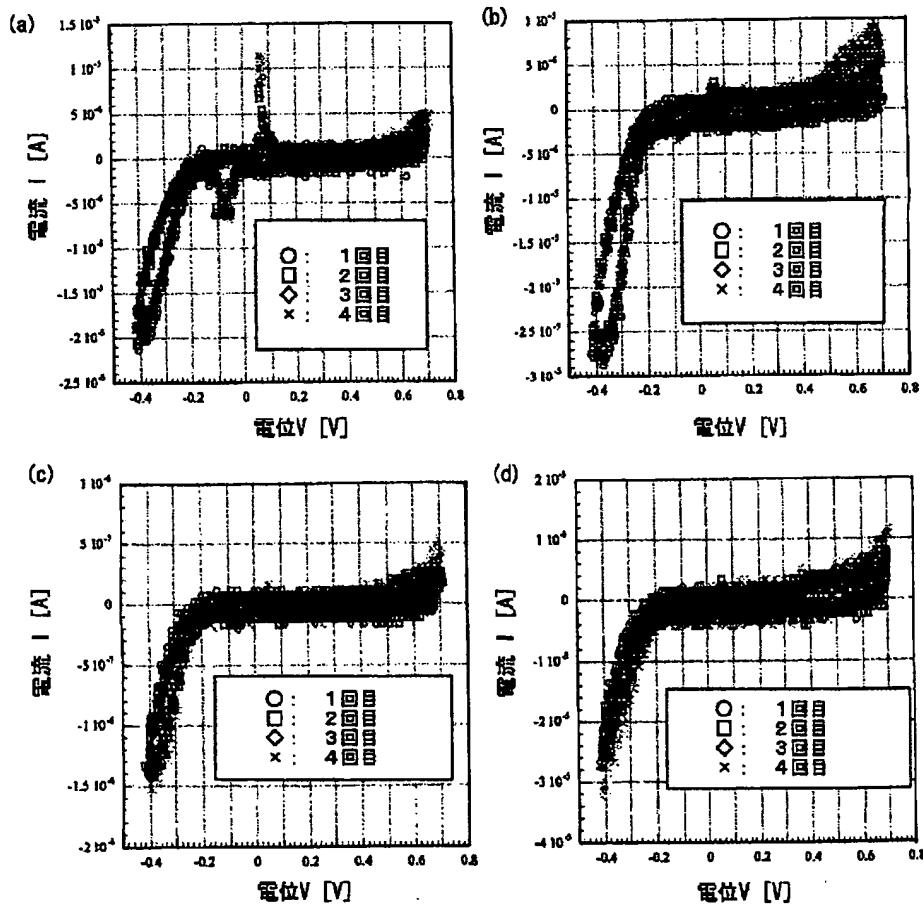
【図2】



【図3】

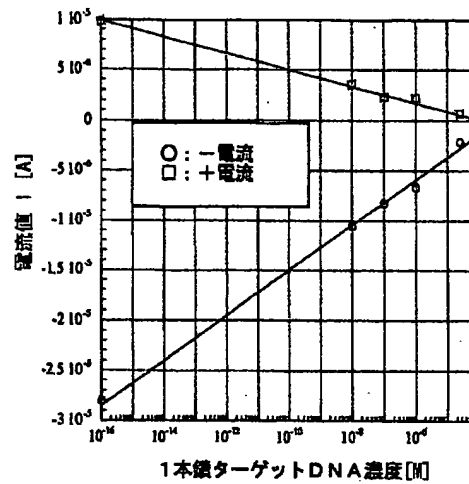


【図4】



(9)

【図5】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7	識別記号	F I	テ-マ-ド' (参考)
G 0 1 N 27/48		G 0 1 N 37/00	1 0 2
33/483		27/30	3 5 1
33/53		C 1 2 N 15/00	F
37/00	1 0 2	G 0 1 N 27/46	3 3 6 B

(72) 発明者 谷口 正輝
 大阪府箕面市小野原東 6 丁目 38-10 ルー
 ブルハイツ111

F タ-ム (参考) 2G045 AA25 DA12 DA13 DA14 DA77
 FB02 FB05 FB16 HA16
 4B024 AA11 AA20 CA01 CA09 HA11
 HA12
 4B029 AA07 FA02 FA10 FA15
 4B063 QA01 QA18 QQ42 QR32 QR55
 QS34 QS39 QX04 QX05